

日本人若年男性における常習喫煙に伴う生体酸化ストレスと 内皮機能障害に関する検討

金沢大学医学部医学科内科学第一講座（主任：小林健一教授）

岡 島 正 樹

喫煙の血管内皮機能におよぼす影響には人種間において差がみられることが報告されている。そこで今回、日本人若年男性において、常習能動喫煙に伴う酸化ストレスが血管内皮機能に影響をおよぼすか否かについて検討した。さらに、抵抗血管と伝導血管の血管内皮機能障害に差がみられるかについても検討した。若年非喫煙男性8名、若年喫煙男性8名を対象とした。内皮依存性血管拡張反応は、上腕の反応性充血と前腕灌流下でのアセチルコリン (acetylcholine, ACh) 投与 ($0.45, 1.5, 4.5 \mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^{-1}$) に対する血管拡張反応を用いた。内皮非依存性血管拡張反応は、ニトログリセリン (nitroglycerin, NTG) を上腕動脈内に投与し評価した。なお、抵抗血管の血管拡張反応は、ストレーンゲージ・プレチスモグラフにて求めた前腕血流量 (forearm blood flow, FBF) から前腕血管抵抗 (forearm vascular resistance, FVR) を算出し、その変化で評価した。伝導血管の血管拡張反応は、高解像度超音波エコー装置を用いて計測した上腕動脈血管径 (brachial arterial diameter, BAD) の反応性充血およびAChによる変化より求めた。生体酸化ストレスは、尿中8-ハイドロキシデオキシグアノシン (8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG) をELISA法にて測定した。ACh, NTGの上腕動脈内投与により、心拍数、動脈圧は不変であった。両群でACh投与によりFBF, BADは用量依存性に増加し、反応性充血によりBADは有意に増加した。両群間の増加率の比較では、反応性充血、低濃度のACh投与およびNTG投与時のFBF, BADの増加率に差はなかった。ACh $4.5 \mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^{-1}$ 投与時のFBFの増加率は両群間で差はなかったが、BADの増加率は喫煙群 $6.3 \pm 4.3\%$ (平均 \pm 標準偏差)、非喫煙群 $15.0 \pm 6.8\%$ と喫煙群で有意に低下していた ($p < 0.05$)。尿中8-OHdGは非喫煙群に比し喫煙群で有意に高値であった。さらに尿中8-OHdGはACh $4.5 \mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^{-1}$ 投与によるFBFの増加率 ($r = 0.626, p < 0.05$) およびBADの増加率 ($r = 0.439, p < 0.05$) と有意な相関関係を示した。以上の結果より、日本人若年男性常習喫煙者では、生体酸化ストレスは明らかに高く、酸化ストレスと内皮依存性血管拡張反応の障害に有意な関連がみられた。また、常習喫煙による内皮機能障害は、抵抗血管に比較し伝導血管に、より早期に出現する可能性が示唆された。

Key words conduit vessel, endothelium-dependent vasodilation, habitual smoking, oxidative stress, resistance vessel

血管内皮細胞は、交感神経などの神経性因子、アンギオテンシンⅡなどの体液性因子とともに血管のトーンを調節するのに加え、血小板凝集や接着の抑制、平滑筋細胞の遊走や増殖の抑制、白血球接着の抑制および抗酸化作用などの生理機能を有し、血管の恒常性の維持に重要な役割を果たしている^{1)~7)}。一方、内皮機能の障害は、プラーク形成などの肉眼的動脈硬化病変に先行してみられ、動脈硬化の初期病変とされている。ヒトにおける検討においても、内皮機能障害は冠動脈疾患患者などの動脈硬化を伴った患者においてみられるのみならず、高脂血症、高血圧、糖尿病、高ホモシステイン血症などの動脈硬化危険因子を持った若年者においてもすでに存在することが報告されている^{8)~13)}。

動脈硬化の3大危険因子の1つである喫煙においても、若年健康者ですでに内皮機能障害が存在し、禁煙により改善することが欧米より報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、日本人は北ヨーロ

ッパやアメリカ合衆国の白人と比較し喫煙率が高いにもかかわらず、冠動脈疾患の発症が正常血圧者、高血圧患者いずれにおいても1/4から1/5と少ないことが示されている¹⁶⁾。近年、日本人と同様に喫煙率が高いにもかかわらず冠動脈疾患の発症が少ない中国人と白人の若年健康者の内皮機能におよぼす喫煙の影響を比較した検討において、白人喫煙者では血管内皮機能の障害がみられるが、中国人若年喫煙者では内皮機能の障害がないことが報告された¹⁷⁾。これらの報告は、喫煙の血管内皮機能におよぼす影響には人種間に差がみられることを示唆している。したがって、中国人と類似した生活様式および冠動脈疾患発症率を示す日本人においても喫煙に対する内皮機能の障害が白人とは異なる可能性があり、日本人若年者を対象とした喫煙の血管内皮機能への影響を検討する必要がある。

喫煙における血管内皮機能障害の原因として、酸化ストレスの関与が示唆されている^{18)~22)}。酸化ストレスの指標として、

平成13年1月11日受付、平成13年2月21日受理

Abbreviations : ACh, acetylcholine; BAD, brachial arterial diameter; FBF, forearm blood flow; FVR, forearm vascular resistance; 8-OHdG, 8-hydroxydeoxyguanosine; NTG, nitroglycerin

脂質過剰酸化産物であるF2イソプロスタンの測定が用いられている²³⁾²⁴⁾。F2イソプロスタンは、アラキドン酸とフリーラジカルとの反応により産生され血中、尿中で比較的安定している。しかし、シクロオキシゲナーゼ依存性に産生される経路も存在し、喫煙のように両者に作用する刺激に対する反応の測定には限界がある。一方、DNAの酸化障害の指標である8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG) は、DNA中のデオキシグアノシンが酸化障害を受けて産生され血中を経て尿中に排泄されるものである。8-OHdGは酸化障害のみで生成され、かつ体内で代謝されることなく排泄される物質であり、新しい酸化ストレスの指標として注目されており²⁵⁾²⁶⁾、喫煙における酸化ストレスの評価には有用な方法と思われる。

一方、ヒトの内皮機能の評価は、冠動脈および四肢動脈を用いて行われている^{27)~33)}。いずれの血管床においてもアセチルコリン (acetylcholine, ACh) に対する伝導血管の血管径の変化や抵抗血管の血管抵抗の変化による評価と、反応性充血時の伝導血管の血管径の変化により行われている。これまでの報告^{34)~40)}は、伝導血管または抵抗血管のいずれかの指標を用いたもので、ヒトにおいてどの血管レベルから血管内皮障害が生じるかについての検討はみられない。

そこで今回、日本人若年常習喫煙者で、非喫煙者に比較し血管内皮機能に障害がみられるか否か、また障害があるとしたら、伝導血管と抵抗血管の内皮機能障害に差がみられるか、そして、新しい酸化ストレスの指標である8-OHdGと喫煙による内皮機能障害に関連がみられるか否か、について検討した。

対 象 と 方 法

I. 対 象

日本人若年男性健康者16名を対象とした。非喫煙者8名、常習喫煙者8名で、それぞれ非喫煙群、喫煙群とした。対象の選択においては、35歳未満で、病歴上特別な疾患の既往がなく、検査前の診察で異常所見を認めず、血圧は収縮期圧は135mmHg、拡張期圧は85mmHg以下であり、かつ体格指標は25kg/m²以下の者とした。年齢は24から31歳 (26.8±2.2歳、平均±標準偏差) で、体格指数は22.7±2.3kg/m²であった。収縮期圧115.4±14.8mmHg、拡張期圧66.8±13.9mmHgで、水槽内の水位の変化により求めた前腕体積は1537.5±117.7mlであった。また、喫煙群のBrinkmann指数は158.8±37.2 (喫煙本数20.6±1.8本/日、喫煙期間7.8±2.0年) であった。非喫煙群、喫煙群の臨床像を表1に示す。両群間で年齢、身長、体重、体格指数、前腕体積に差はなかった。なお、各被検者に対し、検

Table 1. Baseline characteristics in nonsmokers and smokers

Variable	Nonsmokers	Smokers
No of subjects	8	8
Age (yrs)	27.0±2.5	27.0±2.0
Hight (cm)	172.1±4.4	171.3±5.5
Body weght (kg)	69.6±5.4	64.4±9.2
Body mass index (kg/m ²)	23.5±2.0	21.9±2.4
Forearm volume (ml)	1560±111	1515±127

Values are expressed as $\bar{X} \pm SD$.

査前に本研究の目的、内容、合併症につき十分説明をし、書面にて承諾を得た。

II. 方 法

1. 前腕血流量の測定

前腕血流量 (forearm blood flow, FBF) はストレイナージ・プレチスモグラフ EC5R (Hokanson, Bellevue, USA) を用いて、静脈閉塞法⁴¹⁾により測定した (図1)。被検者を仰臥位とし、FBF測定側の上腕近位部に静脈閉塞用のカフを巻き、前腕は肘部で軽く屈曲させて受動的に心臓の高さより上方に保ち静脈を虚脱させた状態とした。前腕の最も太い部分にストレイナージを巻き、上腕の静脈閉塞用のカフを急速に40mmHgの圧で加圧した。この時の動脈流入曲線を記録し、流入曲線の最大傾斜よりFBFを求めた。FBFは少なくとも3回の測定を行い、その平均値を使用した。前腕血管抵抗 (forearm vascular resistance, FVR) は、直接上腕動脈より測定した動脈圧より算出した平均動脈圧 (拡張期圧 - [収縮期圧 - 拡張期圧] / 3, mmHg) をFBFで除して算出した。

2. 上腕動脈血管径の測定

上腕動脈血管径 (brachial arterial diameter, BAD) は、高解像度超音波エコー装置 Aspen (Acuson, Mountain View, USA) を用い、11MHzのリニアプローブにより記録した。図1に示すように、測定側上腕肘部の上腕動脈縦断像を描出し、プローブを固定した。プローブの固定位置は、血管の内中膜複合が少なくとも血管深側にて観察される部位とし、記録はAspen内蔵ハードディスクとスーパーVHSビデオテープに保存した。測定血管径は、同期させた心電図上の拡張末期での血管上壁の外膜-血管下壁の内中膜複合ライン間とした。

3. 内皮依存性血管拡張反応、内皮非依存性血管拡張反応の測定のプロトコル

喫煙の内皮依存性血管拡張反応に対する急性効果をできるだけ少なくするため、検査1時間前より能動的小および受動的喫煙を禁止した。被験者を安静臥位とした後、前胸部に心電図電極を装着し、心電図を記録した。また、検側の上腕肘部より3から5cm近位部にて、上腕動脈に薬物注入および動脈圧測定用に20ゲージ留置針 (テルモ、東京) を穿入した。三方活栓を使用し、一方を動脈注入用シリンジポンプTE311 (テルモ) に接続し薬物注入用に使用し、一方を圧トランスデューサーUK1000 (パ

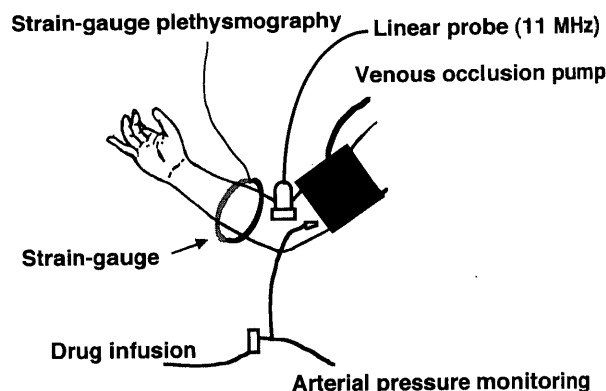


Fig. 1. Schematic illustration of the procedure for forearm perfusion method.

Table 2. Systemic hemodynamic effects of drug infusions

Group	Baseline		Acetylcholine (4.5 $\mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{dl}^{-1}$)		Nitroglycerin (0.08 mg/min)	
	Heart rate (bpm)	Mean arterial pressure (mmHg)	Heart rate (bpm)	Mean arterial pressure (mmHg)	Heart rate (bpm)	Mean arterial pressure (mmHg)
Nonsmokers	63.3 \pm 6.5	85.0 \pm 12.6	63.0 \pm 4.5	83.0 \pm 10.5	65.0 \pm 7.1	81.8 \pm 10.9
Smokers	61.6 \pm 8.3	81.0 \pm 14.4	62.4 \pm 7.2	82.0 \pm 13.6	68.4 \pm 7.1	81.6 \pm 12.3

Results are expressed as $\bar{X}\pm\text{SD}$.

クスター、東京)に接続し、前腕灌流モデルとした(図1)。動脈圧は、心電図とともにポリグラフRM6000(日本光電、東京)に入力し、サーマルアレイレコーダーWS800R(日本光電)にて連続記録した。心電図、動脈留置針およびストレーンゲージ・プレシモグラフをセットした後少なくとも15分以上安静仰臥位とし、その後以下の測定を行った。

1) 反応性充血による内皮依存性血管拡張反応

安静時のFBF, BADを測定後、上腕に巻いた静脈閉塞用カフを200mmHgまで急速に加圧し、5分間阻血した。5分後、加圧していたカフを急速に解除し、その後FBF, BADを30秒ごとに300秒間記録した。

2) AChによる内皮依存性血管拡張反応

ACh(第一製薬、東京)は、流量0.4ml/分にて動脈内へ注入する量で、かつ濃度が0.45, 1.5, 4.5 $\mu\text{g}/\text{分}\cdot\text{dl}^{-1}$ になるように生理食塩水にて調節した。それぞれの濃度の薬液を20mlのシリンジにつめ、動脈内注入用シリンジポンプに装着し、0.4ml/分にて動脈内へ300秒間持続注入した。

反応性充血による内皮機能測定後、少なくとも15分以上の安静時間をおいた。その後、生理食塩水を0.4ml/分にて上腕動脈に持続注入し、FBF, BADが安定した値をとることを確認した後、コントロールを記録した。その後、ACh 0.45 $\mu\text{g}/\text{分}\cdot\text{dl}^{-1}$ 注入を開始し、注入中30秒ごとに心拍数、動脈圧、FBF, BADを300秒間記録した。ACh注入終了後、再び生理食塩水を0.4ml/分にて動脈内に持続注入し、さらに300秒間、30秒ごとに心拍数、動脈圧、FBF, BADを記録した。これらの測定を15分以上の間隔をあけて、ACh 1.5, 4.5 $\mu\text{g}/\text{分}\cdot\text{dl}^{-1}$ を繰り返して投与し同様の測定を行った。

3) 内皮非依存性血管拡張反応

ACh注入終了後、15分以上安静時間をおいた。FBF, BADがコントロール値に復していることを確認した後、ニトログリセリン(nitroglycerin, NTG)(日本化薬、東京)0.08mg/分を流量0.4ml/分にて動脈内へ注入した。60秒ごとに心拍数、動脈圧、FBF, BADを180秒間記録した。

4. 生化学的検査

各被検者の採血を早朝空腹時に行った。測定項目は、血管内皮機能に影響をおよぼす脂質および凝固線溶系とした⁴²⁾⁴³⁾。脂質の指標として総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール、中性脂肪、リポ蛋白質(a)を、凝固線溶系の指標として、フィブリノーゲン、tPA-PAIⅠ複合体、プロテインC、フォン・ウィルブラント因子、アンチトロンビンⅢを測定した。また、生体内酸化ストレスの指標として、DNAの酸化障害のバイオマーカーである尿中8-OHdGを測定した²⁵⁾²⁶⁾。

Table 3. Laboratory data in nonsmokers and smokers

Variable	Nonsmokers	Smokers
Total cholesterol (mg/dl)	187 \pm 21	190 \pm 30
HDL cholesterol (mg/dl)	62 \pm 14	64 \pm 15
LDL cholesterol (mg/dl)	115 \pm 19	124 \pm 34
Triglyceride (mg/dl)	100 \pm 36	87 \pm 36
Lipoprotein (a) (mg/dl)	9.4 \pm 6.2	18.3 \pm 20.5
Fibrinogen (mg/dl)	187 \pm 36	217 \pm 38
tPA/PAI-1 complex (ng/ml)	62 \pm 14	64 \pm 15
Protein C activity (%)	113 \pm 27	114 \pm 39
von Willebrand factor (%)	94 \pm 29	107 \pm 31
Antithrombin Ⅲ activity (%)	115 \pm 7	119 \pm 12
U-8OHdG (ng/ml)	9.0 \pm 3.4	26.3 \pm 6.9*

Results are expressed as $\bar{X}\pm\text{SD}$.

U-8OHdG, urinary 8-hydroxydeoxyguanosine.

Statistical difference between nonsmokers and smokers.

* $p<0.05$.

被験者の早朝尿を採取し、凍結保存した。測定方法は、8-OHdG測定用キット(日本老化制御研究所、静岡)を用い、ELISA法で450nmの吸光度により測定した。

Ⅲ. 統計学的検討

結果は平均 \pm 標準偏差($\bar{X}\pm\text{SD}$)で示した。統計学的検討は、年齢、身長、体重、体格指数、前腕体積および薬剤投与前後の心拍数と平均動脈圧の比較には二標本t検定を用いた。FBF, FVR, BADの各群間の平均値の差の検定には、一元配置、二元配置による分散分析をしたうえで、Sheffeの多重比較を行った。また、FBFおよびBADと8-OHdGとの相関関係は、単回帰分析を用いて相関関数を求め評価した。なお、危険率が0.05未満を統計学的に有意差ありとした。

成 績

Ⅰ. 腕への薬物投与の全身血行動態への影響

上腕動脈へのACh, NTGの注入による平均動脈圧、心拍数の変化を表2に示す。安静時、ACh投与後およびNTG投与後それぞれにおいて、非喫煙群、喫煙群間で平均心拍数、動脈圧に差は認めなかった。また、ACh, NTG投与により、両群いずれも平均動脈圧、心拍数の変化はなく、今回動脈内注入に用いた薬物の投与量では全身の血行動態への影響はなかった。

Ⅱ. 生化学的検査結果

両群の血中の脂質、凝固線溶系の検査値および尿中8-OHdG濃度を表3に示す。両群間で血中の脂質、凝固線溶系の値に差

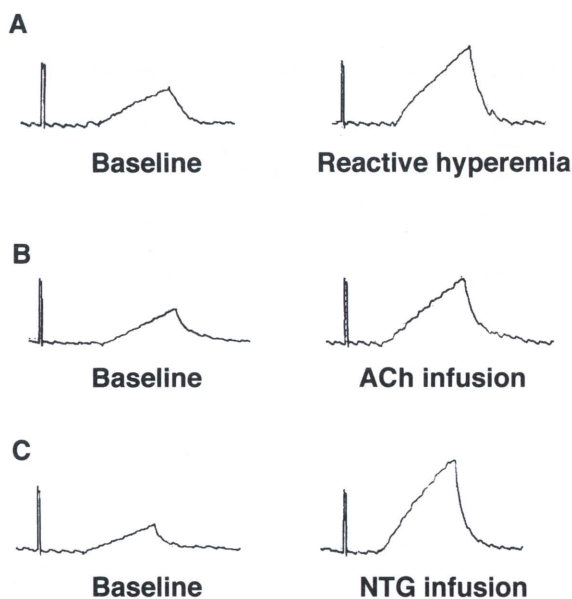


Fig. 2. Typical example of experimental records showing the effects of reactive hyperemia (A), acetylcholine infusion (B) and nitroglycerin infusion (C) on the forearm blood flow.

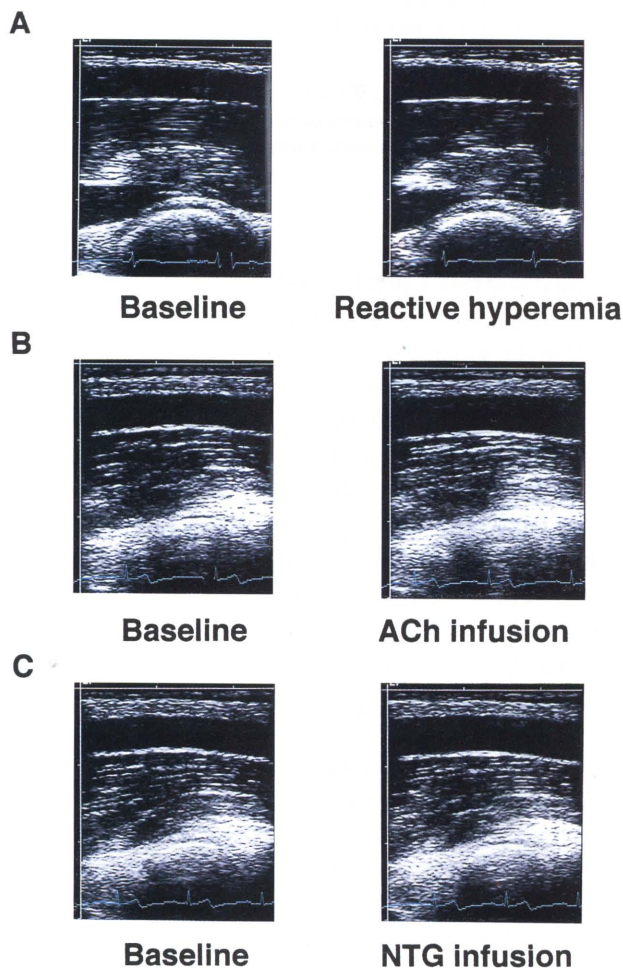


Fig. 3. Typical example of experimental records showing the effects of reactive hyperemia (A), acetylcholine infusion (B) and nitroglycerin infusion (C) on the brachial arterial diameter.

はなかったが、尿中8-OHdG濃度は、非喫煙群に比し喫煙群で有意に高値であった ($p < 0.05$).

Ⅲ. 反応性充血による内皮依存性血管拡張反応

反応性充血時のストレインゲージ・プレチスモグラフの実記録を図2Aに、超音波検査による上腕動脈の実記録を図3Aに示す。反応性充血によりプレチスモグラフ上の流入曲線の傾きは急峻となり、上腕動脈径は拡大している。表4に反応性充血によるFBF, FVR, BADの経時的变化を実測値で示し、図4に変化率で示す。動脈閉塞解除30秒後にFBF, BADは最大血管拡

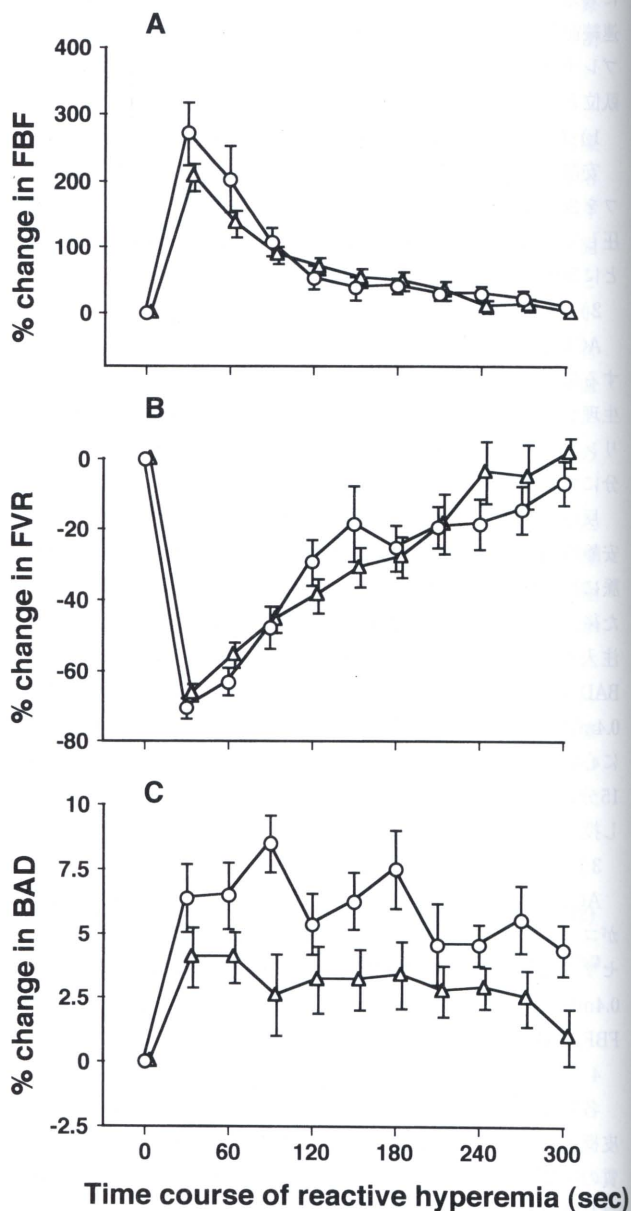


Fig. 4. Percent change in forearm blood flow (A), forearm vascular resistance (B) and brachial arterial diameter (C) during reactive hyperemia. Results are expressed as $\bar{X} \pm SD$. \bigcirc , nonsmokers; \triangle , smokers. FBF, forearm blood flow; FVR, forearm vascular resistance; BAD, brachial arterial diameter.

張を示し、FVRは最小血管抵抗となった。

FBFは、安静時は非喫煙群と喫煙群で差はなかったが、動脈閉塞解除30秒後に非喫煙群では $+271.2 \pm 132.2\%$ 、喫煙群では $+218.5 \pm 49.1\%$ といずれも有意に増加した（それぞれ $p < 0.001$, 図4A）。しかし、最大増加率は両群間で差を認めなかった。60秒後以降は徐々に漸減し300秒後には両群とも前値に復

した。安静時FVRは非喫煙群、喫煙群で有意差はなかったが、動脈閉塞解除30秒後にFVRは、非喫煙群では $-70.5 \pm 8.2\%$ 、喫煙群では $-66.1 \pm 6.6\%$ と有意に減少した（それぞれ $p < 0.001$, 図4B）。しかし、FVRの最大変化率には両群間で差はなかった。なお、60秒後以降漸増し300秒後にはそれぞれ前値に復した。

Table 4. Effects of reactive hyperemia on forearm circulation

Group	Measurements	Baseline	Time course of reactive hyperemia (sec)	
			30	300
Nonsmokers	FBF (ml/100ml \cdot min $^{-1}$)	6.8 ± 1.6	$24.1 \pm 5.6^{**}$	7.9 ± 2.9
	FVR (units)	13.3 ± 4.4	$3.7 \pm 1.0^{**}$	12.6 ± 5.3
	BAD (mm)	4.3 ± 0.4	$4.6 \pm 0.4^{**}$	$4.5 \pm 0.4^{**}$
Smokers	FBF (ml/100ml \cdot min $^{-1}$)	9.8 ± 1.8	$29.3 \pm 4.3^{**}$	9.7 ± 2.1
	FVR (units)	8.6 ± 2.6	$2.9 \pm 0.8^{**}$	8.9 ± 3.0
	BAD (mm)	4.7 ± 0.5	$4.9 \pm 0.5^*$	4.8 ± 0.6

Results are expressed as $\bar{X} \pm SD$. FBF, forearm blood flow; FVR, forearm vascular resistance; BAD, brachial arterial diameter. Statistical difference between baseline and reactive hyperemia.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Table 5. Effects of acetylcholine on forearm circulation

Dose of Ach (μ g/min \cdot dl $^{-1}$)	Group	Measurements	Baseline	Time course during Ach infusion (sec)		Time course after Ach infusion (sec)
				150	300	300
0.45	Nonsmokers	FBF (ml/100ml \cdot min $^{-1}$)	6.3 ± 1.5	$9.9 \pm 4.6^*$	$11.7 \pm 4.6^{**}$	8.0 ± 4.0
		FVR (units)	14.1 ± 4.3	$10.5 \pm 5.8^*$	$8.6 \pm 4.3^{***}$	13.1 ± 6.4
		BAD (mm)	4.4 ± 0.4	4.6 ± 0.3	$4.6 \pm 0.4^{**}$	$4.5 \pm 0.4^*$
	Smokers	FBF (ml/100ml \cdot min $^{-1}$)	7.0 ± 2.3	8.2 ± 3.6	9.0 ± 5.1	6.4 ± 2.2
		FVR (units)	12.7 ± 5.0	10.6 ± 6.3	9.8 ± 5.9	13.0 ± 6.8
		BAD (mm)	4.6 ± 0.6	4.7 ± 0.7	$4.8 \pm 0.6^*$	4.7 ± 0.7
1.5	Nonsmokers	FBF (ml/100ml \cdot min $^{-1}$)	6.5 ± 1.2	12.7 ± 7.8	$16.8 \pm 6.6^{**}$	$8.2 \pm 2.4^*$
		FVR (units)	13.3 ± 2.4	$8.2 \pm 3.3^{**}$	$5.5 \pm 1.7^{***}$	$11.0 \pm 3.1^*$
		BAD (mm)	4.4 ± 0.4	$4.8 \pm 0.5^*$	$4.8 \pm 0.5^{**}$	$4.7 \pm 0.4^*$
	Smokers	FBF (ml/100ml \cdot min $^{-1}$)	7.2 ± 2.1	15.2 ± 14.6	16.8 ± 16.2	7.4 ± 3.3
		FVR (units)	12.4 ± 5.1	9.9 ± 6.8	$7.9 \pm 4.5^*$	13.2 ± 7.0
		BAD (mm)	4.6 ± 0.6	$4.8 \pm 0.7^*$	$4.8 \pm 0.7^*$	4.8 ± 0.7
4.5	Nonsmokers	FBF (ml/100ml \cdot min $^{-1}$)	6.2 ± 1.7	$16.5 \pm 11.0^*$	$28.0 \pm 13.7^{**}$	$10.5 \pm 3.3^{**}$
		FVR (units)	14.4 ± 3.7	$6.4 \pm 2.5^{***}$	$8.8 \pm 2.0^{***}$	$8.9 \pm 3.2^*$
		BAD (mm)	4.4 ± 0.4	$5.0 \pm 0.5^{***}$	$5.1 \pm 0.5^{***}$	$5.0 \pm 0.5^{**}$
	Smokers	FBF (ml/100ml \cdot min $^{-1}$)	6.6 ± 2.5	24.5 ± 24.6	21.8 ± 20.9	10.2 ± 8.1
		FVR (units)	13.5 ± 4.9	$6.8 \pm 5.3^*$	$6.8 \pm 4.8^*$	11.2 ± 5.4
		BAD (mm)	4.6 ± 0.6	$4.8 \pm 0.6^*$	$4.9 \pm 0.7^{**}$	4.9 ± 0.8

Results are expressed as $\bar{X} \pm SD$. Ach, acetylcholine; FBF, forearm blood flow; FVR, forearm vascular resistance; BAD, brachial arterial diameter. Statistical difference between baseline and acetylcholine infusion.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

安静時BADは非喫煙群、喫煙群で差はなかったが、動脈閉塞解除30秒後にBADは非喫煙群で $+6.4 \pm 3.8\%$ 、喫煙群で $+4.0 \pm 3.5\%$ といずれも有意に増加した(それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$; 図4C)。しかし、最大変化率は両群間で差はなかった。

Ⅳ. ACh投与による内皮依存性血管拡張反応

ACh $4.5 \mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^{-1}$ 投与時のストレインゲージ・プレチスモグラフの実記録を図2Bに、超音波検査による上腕動脈の実記録を図3Bに示す。AChによりプレチスモグラフ上の流入曲線の傾きは急峻となり、上腕動脈径は拡大している。表5に各濃度のACh投与によるFBF, FVR, BADの経時変化を実測値で示し、図5にACh $4.5 \mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^{-1}$ 投与時の経時変化を变化率で示す。いずれの濃度においてもACh投与300秒後にFBF, BADは最大値を示し、FVRは最小値となった。

ACh 0.45, 1.5, $4.5 \mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^{-1}$ 投与300秒後のFBFの変化率

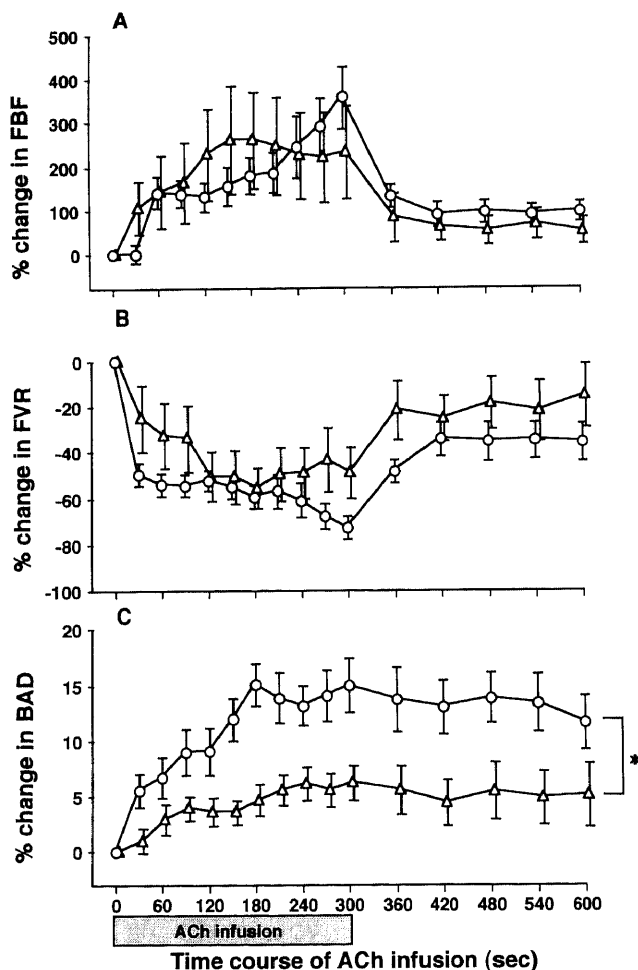


Fig. 5. Percent change in forearm blood flow (A), forearm vascular resistance (B) and brachial arterial diameter (C) during and after acetylcholine infusion at a dose of $4.5 \mu\text{g}/\text{min} \cdot \text{dl}^{-1}$. Results are expressed as $\bar{X} \pm \text{SD}$. \circ , nonsmokers; \triangle , smokers. FBF, forearm blood flow; FVR, forearm vascular resistance; BAD, brachial arterial diameter. Statistical difference between smokers and nonsmokers. * $p < 0.05$.

は、非喫煙群でそれぞれ $+80.7 \pm 47.5\%$, $+160.3 \pm 101.9\%$, $+355.5 \pm 199.8\%$ 、喫煙群でそれぞれ $+35.0 \pm 66.9\%$, $+114.3 \pm 147.2\%$, $+231.0 \pm 295.2\%$ であり、両群とも用量依存性にFBFは増加した(図6A)。しかし、各ACh濃度における血管拡張反応には、両群間で差を認めなかった。ACh 0.45, 1.5, $4.5 \mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^{-1}$ 投与300秒後のFVRの変化率は、非喫煙群でそれぞれ $-40.4 \pm 20.5\%$, $-57.6 \pm 12.2\%$, $-72.9 \pm 13.8\%$ 、喫煙群でそれぞれ $-14.4 \pm 63.9\%$, $-37.4 \pm$

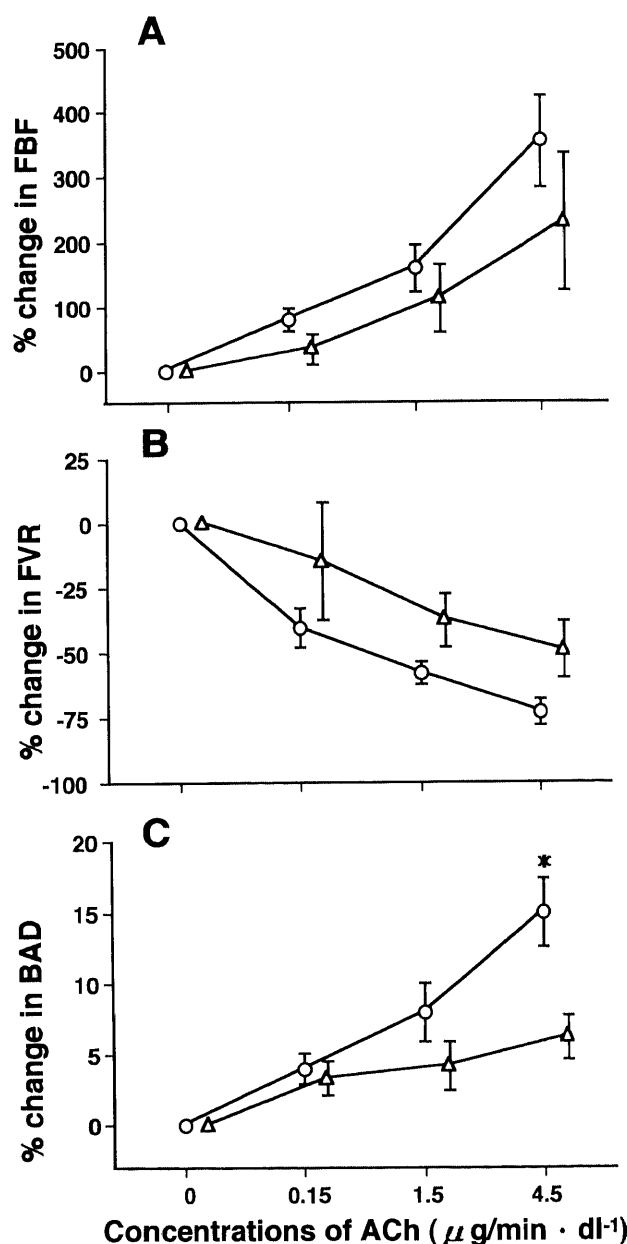


Fig. 6. Effects of acetylcholine at doses of 0.15, 1.5, $4.5 \mu\text{g}/\text{min} \cdot \text{dl}^{-1}$ on forearm blood flow (A), forearm vascular resistance (B) and brachial arterial diameter (C). Results are expressed as $\bar{X} \pm \text{SD}$. \circ , nonsmokers; \triangle , smokers. FBF, forearm blood flow; FVR, forearm vascular resistance; BAD, brachial arterial diameter. Statistical difference between smokers and nonsmokers. * $p < 0.05$.

Table 6. Effects of nitroglycerin on forearm circulation

Group	Measurements	Baseline	Nitroglycerin infusion
Nonsmokers	FBF (ml/100ml · min ⁻¹)	6.3 ± 1.3	23.4 ± 8.0**
	FVR (units)	13.2 ± 3.0	4.0 ± 1.3**
	BAD (mm)	4.5 ± 0.5	5.2 ± 0.5**
Smokers	FBF (ml/100ml · min ⁻¹)	7.2 ± 3.0	28.6 ± 15.7*
	FVR (units)	13.8 ± 8.9	3.4 ± 1.5*
	BAD (mm)	4.9 ± 0.7	5.3 ± 0.6*

Results are expressed as $\bar{X} \pm \text{SD}$. FBF, forearm blood flow; FVR, forearm vascular resistance; BAD, brachial arterial diameter. Statistical difference between baseline and nitroglycerin infusion.

* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$.

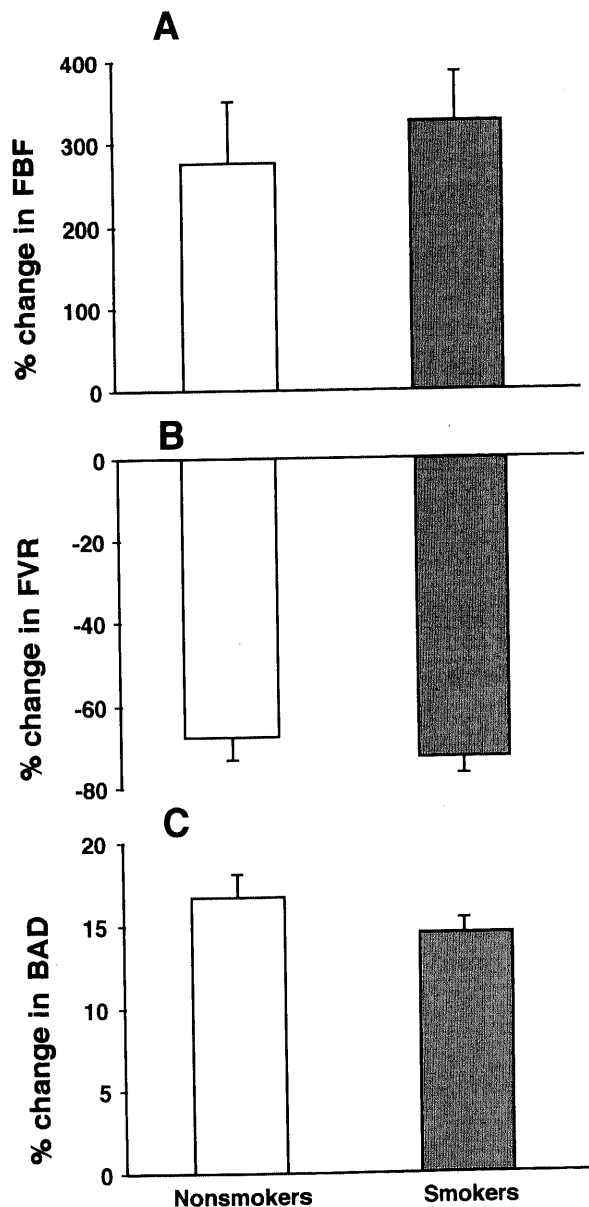


Fig. 7. Percent change in forearm blood flow (A), forearm vascular resistance (B) and brachial arterial diameter (C) during nitroglycerin infusion. Results are expressed as $\bar{X} \pm \text{SD}$. □, nonsmokers; ■, smokers. FBF, forearm blood flow; FVR, forearm vascular resistance; BAD, brachial arterial diameter.

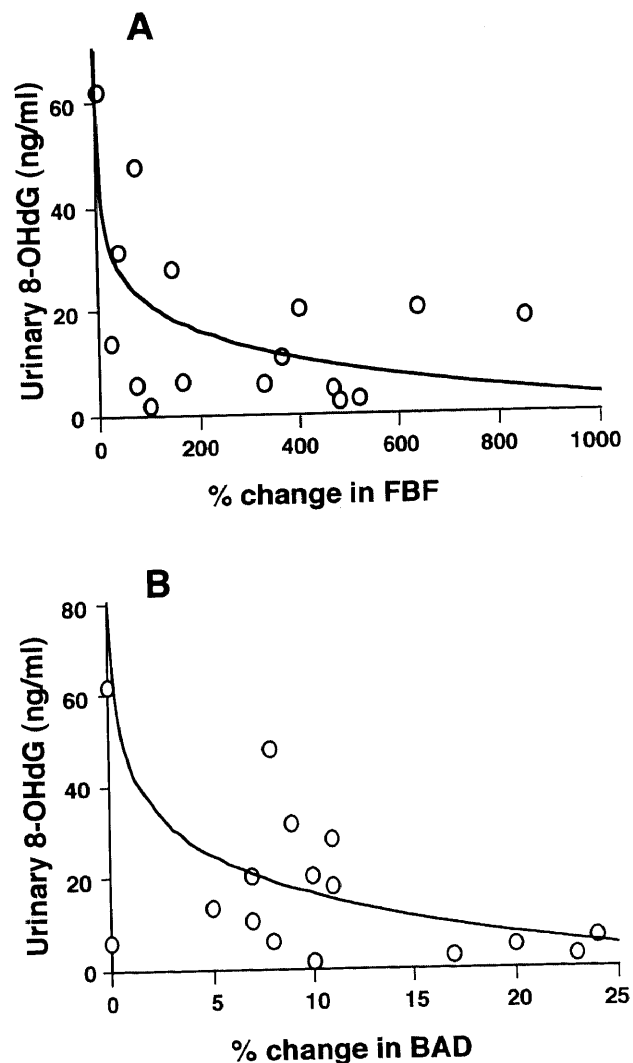


Fig. 8. Relation between urinary 8-OHdG and percent change in forearm blood flow (A) or brachial arterial diameter (B) during acetylcholine infusion. There was significant correlation between urinary 8-OHdG and forearm blood flow ($r = 0.626$, $p < 0.05$) or brachial arterial diameter ($r = 0.439$, $p < 0.05$). 8-OHdG, 8-hydroxydeoxyguanosine

29.3%, $-49.0 \pm 30.8\%$ であり, 両群とも用量依存性にFVRは減少した(図6B). しかし, 各ACh濃度における血管抵抗の減少率には, 両群間で差は認めなかった. ACh 0.45, 1.5, 4.5 $\mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^{-1}$ 投与300秒のBADの変化率は, 非喫煙群でそれぞれ $+4.0 \pm 3.2\%$, $+8.0 \pm 5.9\%$, $+15.0 \pm 6.8\%$, 喫煙群でそれぞれ $+3.3 \pm 3.5\%$, $+4.3 \pm 4.8\%$, $+6.3 \pm 4.3\%$ であり, 両群とも用量依存性にBADは増加した(図6C). また, 両群における比較では, ACh 0.45, 1.5 $\mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^{-1}$ では血管拡張反応に両群間で差はなかったが, ACh 4.5 $\mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^{-1}$ による血管拡張反応は非喫煙群に比し喫煙群で有意に低下していた($p < 0.05$, 図6C).

V. NTG投与による内皮非依存性血管拡張反応

NTG投与時のストレインゲージ・プレシスモグラフおよび超音波検査の実記録を図2C, 図3Cに示す. NTGによりプレシスモグラフ上の流入曲線の傾きは急峻となり, 上腕動脈径は拡大している. 表6にNTG投与によるFBF, FVR, BADの変化を実測値で示す. 安静時FBFは非喫煙群と喫煙群で差はなかった. NTG投与後FBFは非喫煙群では $+277.6 \pm 204.7\%$, 喫煙群では $+326.6 \pm 171.8\%$ と有意(それぞれ $p < 0.01$)に増加したが, 増加率は両群間で差はなかった(図7A). 安静時FVRは非喫煙群と喫煙群で差はなかった. NTG投与により非喫煙群では $-67.6 \pm 15.7\%$, 喫煙群では $-72.6 \pm 11.6\%$ と有意(それぞれ $p < 0.001$)に減少したが, 減少の程度には両群間で差はなかった(図7B). 安静時BADも非喫煙群と喫煙群で差はなかった. NTG投与により非喫煙群では $+16.8 \pm 4.1\%$, 喫煙群では $+14.5 \pm 2.6\%$ と有意(それぞれ $p < 0.001$)に増加し, かつ増加の程度には両群間で差はなかった(図7C).

VI. 酸化ストレスと内皮依存性血管拡張反応の相関関係

図8に尿中8-OHdGとACh 4.5 $\mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^{-1}$ によるFBFおよびBADの変化率との回帰対数曲線を示す. 尿中8-OHdGとFBF変化率との間には $r = 0.626$ ($p < 0.05$)の, BAD変化率と $r = 0.439$ ($p < 0.05$)の対数相関関係がみられた. しかし, 反応性充血およびNTGによるFBFとBADの変化率と尿中8-OHdGには相関はみられなかった.

考 察

今回, 日本人若年男性常習喫煙者において血管内皮に障害がみられるか否か, 障害がみられるとしたら伝導血管と抵抗血管で障害の程度の差がみられるか, さらに喫煙に伴う血管内皮機能障害に生体酸化ストレスが関与するか否かを検討した. その結果, 日本人若年男性常習喫煙者では, 8-OHdGで評価した酸化ストレスの程度は非喫煙群に比較し有意に高値を示した. 反応性充血による上腕動脈の血管拡張反応で評価した伝導血管の内皮機能には両群間で差はなかったが, AChの動脈内投与による上腕動脈の血管拡張反応は喫煙群が非喫煙群に比較し有意に低下していた. 一方, AChの動脈内投与によるFBFの増加で評価した抵抗血管の血管内皮機能には両群間で差はなかった. また, ACh投与によるBAD, FBFの増加率は8-OHdGと有意な相関を示した. なお, NTGの動脈内投与によるBAD, FBFの増加反応には両群間で差はなく, 喫煙による伝導血管および抵抗血管の内皮非依存性血管拡張反応の障害はみられなかった. これらの成績は, 日本人若年常習喫煙者においても血管内皮機能の障害がみられ, その障害に生体酸化ストレスが関与していることを示唆している. また, 喫煙による内皮機能障害は,

抵抗血管に比較し伝導血管で, より早期に出現するものと思われる.

血管内皮細胞は血管緊張のトーンスを調節するとともに, 血小板凝集や接着の抑制, 平滑筋細胞遊走や増殖の抑制および抗酸化作用などの生理機能を有し, 血管の恒常性の維持に重要な役割をはたしている^{1)~7)}. 一方, 内皮機能の障害は, プラーク形成などの肉眼的動脈硬化病変に先行してみられ, 動脈硬化の初期病変とされている. ヒトにおける検討においても, 内皮機能障害は冠動脈疾患患者などの動脈硬化を伴った患者においてみられるのみならず, 高脂血症, 高血圧, 糖尿病, 肥満, 高ホモシステイン血症, 加齢, 閉経などの動脈硬化危険因子を持った健常者においても, 臨床的な動脈硬化病変が出現する前にすでに内皮機能障害が存在することが報告されている^{8)~13)34)~37)40)44)}. 動脈硬化の3大危険因子の1つである喫煙においても, 若年健常者ですでに内皮機能障害が存在し, 禁煙により改善することが示されている¹⁴⁾¹⁵⁾. Celermajerら¹⁵⁾は, 若年健常成人を対象に反応性充血に対する上腕動脈拡張反応を検討し, 血管内皮機能は喫煙量に比例して低下し, 禁煙者は非喫煙者と喫煙者の中間の内皮機能を示すことを報告した. この成績は, 喫煙により動脈硬化病変が出現する前に内皮機能障害が出現し, その障害の一部は可逆性的変化であることを示している. しかし, 喫煙の内皮機能をみた報告の多くは欧米人を対象としたものであり, 日本人における系統だった報告はみられない. 日本人は北ヨーロッパやアメリカ合衆国の白人と比較し喫煙率が高いにもかかわらず, 冠動脈疾患の発症が正常血圧者, 高血圧患者いずれにおいても1/4から1/5と少ないとされている¹⁶⁾. さらに近年, Wooら¹⁷⁾は, 日本人と同様に喫煙率が高いにもかかわらず冠動脈疾患の発症が少ない中国人の若年健常者の内皮機能におよぼす喫煙の影響を白人と比較した検討において, 白人喫煙者では反応性充血により評価した血管内皮機能の障害がみられるが, 中国人若年喫煙者では内皮機能の障害がないことを報告した. また, その成因として抗酸化作用を持つお茶や食物を多く摂取している可能性を示した. これらの報告は, 喫煙の血管内皮機能におよぼす影響には人種間に差がみられ, 中国人と類似した生活様式および冠動脈疾患発症率を示す日本人においても, 喫煙に対する内皮機能の障害が白人とは異なる可能性を示唆している. 今回の日本人若年喫煙者を対象とした検討では, 反応性充血に対する上腕動脈の血管拡張反応は喫煙群と非喫煙群で差はなかったが, AChに対する上腕動脈拡張反応は非喫煙群に比較し喫煙群で有意に低下していた. 流量依存性血管拡張反応(反応性充血)に差がみられなかった点は, Wooら¹⁷⁾の中国人の成績と一致し, 日本人も中国人と同様に白人に比較し喫煙による血管内皮機能障害が出現しにくいことを示唆している. 一方, 高濃度AChに対する上腕動脈拡張反応は, 非喫煙群に比し喫煙群で有意に低下しており, 程度の差はあれ日本人若年常習喫煙者においても喫煙による内皮機能の障害が存在することを示している. 今回, 反応性充血とACh上腕動脈注入法で異なった成績がみられた. 反応性充血は, 虚血解除後の血流増加に伴う血管内壁すり応力の変化に対する内皮細胞の反応をみるものである. 一方, AChに対する上腕動脈の拡張は, 直接内皮細胞のACh受容体に作用し, NO合成酵素を活性化しNO産生を増加させる反応に, 抵抗血管の拡張による血流量増加に伴うすり応力の変化に対する内皮細胞の反応が加わったものである. 今回の検討において, 反応性充血と高濃度

ACh注入により、いずれの群も同程度にFBFの増加がみられた。したがって、ACh受容体への作用が加わった分、ACh上腕動脈注入法が反応性充血より鋭敏な内皮機能の評価法である可能性を示唆している。しかし、上腕動脈径に対する反応性充血とACh注入の影響を直接比較した報告はこれまでなく、今後喫煙以外の内皮機能障害における両方法の比較を行う必要がある。

喫煙における内皮機能障害の成因は明らかではない。しかし、禁煙により内皮機能障害が一部改善すること¹⁵⁾、抗酸化物質であるビタミンEやビタミンCの急性投与により内皮機能障害が改善する^{45) 46)}ことから、酸化ストレスの関与が示唆されている。さらに、喫煙における酸化ストレスの指標として、脂質過酸化産物であるF2イソプロスタンの測定が用いられ、その成績が報告されている^{23) 24)}。それらの報告では、喫煙者が非喫煙者に比較し血中F2イソプロスタン濃度および尿中F2イソプロスタン排泄量が有意に高値を示し、その値は喫煙量と比例し、禁煙およびビタミンCの投与により低下することが示されている。F2イソプロスタンはアラキドン酸とフリーラジカルとの反応により産生され血中、尿中で比較的安定している。しかし、シクロオキシゲナーゼ依存性に産生される経路も存在し、喫煙のように両者に作用する刺激に対する反応の測定には限界がある。一方、近年、Kasaiら⁴⁷⁾は、生体内でのDNAの酸化により生成される8-OHdGを発見し、尿中での定量化に成功した。8-OHdGは、DNA中の2'-デオキシグアノシンが酸化障害を受けその8位が酸化されて生成され、DNA修復酵素により正常なデオキシグアノシンと置換、切離され血中を経て尿中に排泄されるものである。8-OHdGは酸化障害のみで生成され、かつ体内で代謝されることなく排泄される物質であり、新しい酸化ストレスの指標として注目される^{25) 26) 48) - 50)}。今回、この尿中8-OHdGを酸化ストレスの指標として用い、喫煙における酸化ストレスと内皮機能障害の関係を検討した。その結果、喫煙群で尿中8-OHdGが非喫煙群に比較し有意に高値を示し、かつ高濃度AChに対するBADおよびFBF反応と有意な相関を示した。この成績は、日本人若年喫煙者においても酸化ストレスの増加がみられ、内皮機能障害との関連を示唆している。酸化ストレスによる内皮機能障害が可逆性か否かについては、一定の結論は得られていない。すなわち、抗酸化物質であるビタミンCやビタミンEの急性投与では内皮機能の改善がみられているが、慢性投与においては内皮機能の改善がみられていない^{45) 46)}。この急性効果と慢性効果の差の原因は明らかではないが、慢性効果の評価は極めて臨床的に重要な問題であり、今後種々の抗酸化物質を含む食物や薬物の喫煙者の内皮機能におよぼす慢性効果を検討する必要がある。

今回の検討では、内皮機能の評価を反応性充血による伝導血管の拡張反応と、AChによる伝導血管の拡張反応および抵抗血管の血流増加反応により行った。その結果、喫煙群で抵抗血管の内皮機能と反応性充血で評価した伝導血管の内皮機能には障害はみられなかったが、高濃度AChで評価した伝導血管の内皮機能にのみ障害がみられた。現在、ヒトの内皮機能の評価は、冠動脈および四肢動脈を用いて行われている^{27) - 33)}。いずれの血管床においてもAChに対する伝導血管の血管径の変化や抵抗血管の血管抵抗の変化による評価と、反応性充血時の伝導血管の血管径の変化により行われている。冠動脈での検討や四肢血管でのAChに対する血管反応の評価は、いずれも観血的検

査である欠点がある。一方、高解像度超音波装置を用いた反応性充血に対する四肢血管の拡張反応による評価法は、簡便、非観血的かつ再現性もあり、冠動脈疾患の病態をよく反映することから、現在ヒト内皮機能の評価に広く用いられている。しかし、今回の日本人若年男性における喫煙と内皮機能の関係をみた検討では、反応性充血を用いた評価法では伝導血管の内皮機能の障害は発見できず、高濃度AChでのみ差がみられた。この成績は、反応性充血を用いた四肢血管の拡張反応には感受性の面で問題があることを示している。また、これまでの報告^{34) - 40)}は、伝導血管または抵抗血管のいずれかの指標を用いたもので、ヒトにおいてどの血管レベルから血管内皮機能障害が生じるかについての検討はみられない。今回、この点を明らかにするため、抵抗血管の反応をAChに対する血流量の変化で評価、そして伝導血管の反応を反応性充血とAChに対する血流量の変化で評価し、さらに伝導血管の反応を反応性充血とAChに対する上腕動脈の径の変化で評価した。その結果、AChに対する上腕動脈径の変化のみ喫煙群で障害がみられた。この成績は、喫煙による内皮機能障害は抵抗血管に比し伝導血管により早期に出現することを示唆している。この現象が動脈硬化初期病変において共通したものか否かについては、今後種々の動脈硬化危険因子を有した健常者で、同様の検討を行う必要がある。

今回の検討において、いくつかの点について言及する必要がある。第一に、比較的少人数を対象とした点である。しかし、これまでの若年成人での検討と比較し、35歳以下と年齢制限を若くし、高血圧、肥満などの動脈硬化危険因子を持つものを厳密に除外した。また性差および月経周期による影響も除くため、対象を男性のみとした。その結果、今回の喫煙群と非喫煙群では、内皮機能に影響を与える年齢、血圧、体格指数、脂質値および凝固線溶機能には差はなく、常習喫煙の内皮機能への影響のみを評価したと思われる。第二に、上腕動脈への薬物投与の全身血行動態への影響である。この点については、各濃度のAChおよびNTG投与間に十分な時間をおき、全身血行動態モニター下に行った。その結果、喫煙群、非喫煙群いずれにおいても動脈圧、心拍数の測定前値に有意な差はなく、また薬物動注による変化もみられなかった。第三に、喫煙の急性効果をできるだけ少なくするため、検査の1時間以上前より能動的および受動的喫煙を禁止した。ニコチンは口腔粘膜、気道粘膜より速やかに吸収され、血液を介して交感神経系および副腎髄質などに作用し、遊離したカテコラミンが血管機能に影響をおよぼすとされている。ニコチンの半減期は約30分であり、速やかに代謝されコチニンとなり尿中へ排泄される。Cryerら⁵¹⁾は喫煙により血中カテコラミン、心拍数および動脈圧の上昇が喫煙後10分以内にみられるが、30分ですべて前値に戻ることを示している。また、Quillenら⁵²⁾は喫煙後5分で冠動脈血管径および血流量の減少がみられ、30分で前値に戻ることを報告しており、今回の検討で喫煙による急性効果はほとんどないと思われる。

今回の検討では、反応性充血で評価した内皮機能には異常はみられなかったが、高濃度AChに対する血管反応には障害がみられた。この成績は、日本人においても喫煙は若年時より内皮機能障害をもたらす、動脈硬化病変の進展への要因となることを示しており、禁煙や抗酸化物質を含む食物や薬物による予防の必要性を示している。

結 論

日本人若年常習喫煙者で血管内皮機能に障害がみられるか否か、障害があるとしたら抵抗血管、伝導血管で差がみられるか、また常習喫煙に伴う生体酸化ストレスと内皮機能障害との関連を明らかにするため、反応性充血およびAChの血管内投与に対する内皮依存性血管拡張反応、NTGの血管内投与に対する内皮非依存性血管拡張反応を、抵抗血管の血流増加と伝導血管の血管径の変化を同時に評価し、比較した。また生体酸化ストレスの指標として尿中8-OHdGを測定し、内皮依存性血管拡張反応との関連性を検討し、以下の結果を得た。

1. ACh, NTGの上腕動脈への投与により、心拍数、動脈圧に明らかな変化はなく、今回の薬物投与では全身循環動態への影響はなかった。

2. 日本人若年常習喫煙者では非喫煙者に比し尿中8-OHdGが有意に高値であり、喫煙者で生体酸化ストレスの増加がみられた。

3. 反応性充血により、両群ともFBF, BADは有意に増加し、FVRは有意に低下したが、その変化の程度には非喫煙群と喫煙群の間に差はなかった。

4. ACh投与により、両群とも用量依存性にFBF, BADは増加し、FVRは減少した。両群間の比較では、ACh $4.5 \mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^1$ 投与におけるBADの増加が非喫煙群に比較し喫煙群で有意に低下していた。

5. NTG投与によるFBF, FVR, BADの変化は、いずれにおいても非喫煙群と喫煙群の間に差はなかった。

6. ACh $4.5 \mu\text{g}/\text{分} \cdot \text{dl}^1$ によるFBF, BAD増加率は、尿中8-OHdGと回帰対数相関関係を認めた。

以上より、日本人若年男性常習喫煙者では、生体酸化ストレスが高く、酸化ストレスと内皮依存性血管拡張反応の障害に関連がみられた。また、常習喫煙による内皮機能障害は、抵抗血管に比較し伝導血管に、より早期に出現する可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師金沢大学医学部医学科内科学第一講座小林健一教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導、御教示を賜りました金沢大学医学部保健学科高田重男教授、金沢大学医学部第一内科高村雅之博士をはじめ金沢大学医学部第一内科循環器班の諸先生方に心から感謝致します。

文 献

- 1) Toda N, Okamura T. Reciprocal regulation by putatively nitroxidergic and adrenergic nerves of monkey and dog temporal arterial tone. *Am J Physiol* 261: H1740-H1745, 1991
- 2) Schwartz SM, de Blois D, O'Brien ERM. The intima: Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 77: 445-465, 1995
- 3) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980
- 4) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987
- 5) Niu XF, Smith CW, Kubes P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial

cell adhesion to neutrophils. *Circ Res* 74: 1133-1140, 1994

- 6) Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 14: 753-759, 1994
- 7) Oliver JA. Endothelium-derived relaxing factor contributes to the regulation of endothelial permeability. *J Cell Physiol* 151: 506-511, 1992
- 8) Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 340: 1111-1115, 1992
- 9) Fossum E, Hoiegggen, Moan A, Rostrup M, Nordby G, Kjeldsen SE. Relationship between insulin sensitivity and maximal forearm blood flow in young men. *Hypertension* 32: 838-843, 1998
- 10) Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: An effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation* 99: 1156-1160, 1999
- 11) Drexler H, Zeiher AM. Endothelial function in human coronary arteries in vivo: Focus on hypercholesterolemia. *Hypertension* 18 (suppl II): II-90-II-99, 1991
- 12) Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, Libby P. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol* 31: 684-691, 1998
- 13) Taddei S, Virdis A, Mattei P, Natali A, Ferrannini E, Salvetti A. Effect of insulin on acetylcholine-induced vasodilation in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 92: 2911-2918, 1995
- 14) Moliterno DJ, Willard JE, Lange RA, Negus BH, Boehr JD, Glammann DB, Landau C, Rossen JD, Winniford MD, Hillis LD. Coronary-artery vasoconstriction induced by cocaine, cigarette smoking, or both. *N Engl J Med* 330: 454-459, 1994
- 15) Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 88 (part 1): 2149-2155, 1993
- 16) van den Hoogen PCW, Feskens EJM, Nagelkerke NJD, Menotti A, Nissinen A, Kromhout D, for the Seven Countries Study Research Group. The relation between blood pressure and mortality due to coronary heart disease among men in different parts of the world. *N Engl J Med* 342: 1-8, 2000
- 17) Woo KS, Robinson JTC, Chook P, Adams MR, Yip G, Mai ZJ, Lam CWK, Sorensen KE, Deanfield JE, Celermajer DS. Differences in the effect of cigarette smoking on endothelial function in Chinese and white adults. *Ann Intern Med* 127: 372-375, 1997
- 18) Kita T, Yokode M, Arai H, Iiyama M, Ueda Y, Ueyama K, Narumiya S. Cigarette smoke, LDL and cholesteryl ester accumulation in macrophages: Implications for atherosclerosis.

Ann NY Acad Sci 686: 91-98, 1993

- 19) Grinberg-Funes RA, Singh VN, Perera FP, Bell DA, Young TL, Dickey C, Wang LW, Santella RM. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in smokers and their relationship to micronutrient levels and the glutathione-S-transferase M1 genotype. *Carcinogenesis* 15: 2449-2454, 1994
- 20) Salvemini D, Botting R. Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. *Trends Pharmacol Sci* 14: 36-42, 1993
- 21) James RW, Leviev I, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation* 101: 2252-2257, 2000
- 22) Ueda S, Matuoka H, Miyazaki H, Usui M, Okuda S, Imaizumi T. Tetrahydrobioprotein restores endothelial function in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol* 35: 71-75, 2000
- 23) Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 332: 1198-1203, 1995
- 24) Reilly M, Delanty N, Lawson JA, FitzGerald GA. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 94: 19-25, 1996
- 25) Yin B, Whyatt RM, Perera FP, Randall MC, Cooper TB, Santella RM. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *Free Radic Biol Med* 18: 1023-1032, 1995
- 26) Shigenaga MK, Ames BN. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 10: 211-216, 1991
- 27) Ander TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 34: 631-638, 1999
- 28) Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrange D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, Selwyn AP. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 26: 1235-1241, 1995
- 29) Sinoway LI, Hendrickson C, Davidson WR Jr, Prophet S, Zelis R. Characteristics of flow-mediated brachial artery vasodilation in human subjects. *Circ Res* 64: 32-42, 1989
- 30) Nakamura T, Saito Y, Kato T, Sumino H, Hoshino J, Ono Z, Sakamaki T, Nagai R. Flow-mediated vasodilation of a conduit artery in relation to downstream peripheral tissue blood flow during reactive hyperemia in humans. *Jpn Circ J* 61: 772-780, 1997
- 31) Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Maruoka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Takeshita A. Impaired coronary blood flow response to acetylcholine in patients with coronary risk factors and proximal atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 91: 29-37, 1993
- 32) Hodgson JM, Marshall JJ. Direct vasoconstriction and endothelium-dependent vasodilation: Mechanisms of acetylcholine effects on coronary flow and arterial diameter in

patients with nonstenotic coronary arteries. *Circulation* 79: 1043-1051, 1989

- 33) McFadden EP, Clarke JG, Davies GJ, Kaski JC, Haider AW, Maseri A. Effect of intracoronary serotonin on coronary vessels in patients with stable angina and patients with variant angina. *N Engl J Med* 324: 648-654, 1991
- 34) Higashi Y, Sasaki S, Sasaki N, Nakagawa K, Ueda T, Yoshimizu A, Kurisu S, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. Daily aerobic exercise improves reactive hyperemia in patients with essential hypertension. *Hypertension* 33 (part II): 591-597, 1999
- 35) Muiesan ML, Salvetti M, Monteduro C, Rizzoni D, Zulli R, Corbellini C, Brun C, Agabiti-Rosei E. Effect of treatment on flow-dependent vasodilation of the brachial artery in essential hypertension. *Hypertension* 33 (part II): 575-580, 1999
- 36) Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO III, Panza JA. Impairment of the nitric oxide-mediated vasodilator response to mental stress in hypertensive but not in hypercholesterolemic patients. *J Am Coll Cardiol* 32: 1207-1213, 1998
- 37) Koh KK, Cardillo C, Bui MN, Hathaway L, Csako G, Wacławski MA, Panza JA, Cannon RO III. Vascular effects of estrogen and cholesterol-lowering therapies in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Circulation* 99: 354-360, 1999
- 38) Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, Theroux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (Reduction of Cholesterol in Ischemia and Function of the Endothelium) Trial. *Circulation* 99: 3227-3233, 1999
- 39) Neunteufl T, Kostner K, Katzenschlager R, Zehetgruber M, Maurer G, Weidinger F. Additional benefit of vitamin E supplementation to simvastatin therapy on vasoreactivity of the brachial artery of hypercholesterolemic men. *J Am Coll Cardiol* 32: 711-716, 1998
- 40) Chowieńczyk PJ, Watts GF, Cockcroft JR, Ritter JM. Impaired endothelium-dependent vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolaemia. *Lancet* 340: 1430-1432, 1992
- 41) Whitney RJ. The measurement of volume changes in human limbs. *J Physiol* 121: 1-27, 1953
- 42) Sayer JW, Gutteridge C, Syndercombe-Court D, Wilkinson P, Timmis AD. Circadian activity of the endogenous fibrinolytic system in stable coronary artery disease: Effects of beta-adrenoreceptor blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 32: 1962-1968, 1998
- 43) Tomiyama H, Kimura Y, Mitsuhashi H, Kinouchi T, Yoshida H, Kushiro T, Doba N. Relationship between endothelial function and fibrinolysis in early hypertension. *Hypertension* 31 (part 2): 321-327, 1998
- 44) Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Kuga T, Urabe Y, Takeshita A. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation* 88: 77-81, 1993
- 45) Neunteufl T, Priglinger U, Heher S, Zehetgruber M, Soregi

